

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180507003

http://www.yykxjz.cn/

吴欢欢, 王伟继, 吕丁, 胡玉龙, 孔杰. 应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 84-94

Wu HH, Wang WJ, Lü D, Hu YL, Kong J. Turbot (*Scophthalmus maximus*) biodiversity assessment using high-throughput Illumina sequencing to analyze juvenile turbot intestines and their bacterial cultures. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 84-94

应用高通量测序技术分析大菱鲆幼鱼肠道及其养殖环境的微生物群落结构*

吴欢欢^{1,2} 王伟继² 吕丁² 胡玉龙² 孔杰^{1,2①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业资源可持续利用重点实验室 青岛 266071)

摘要 采用基于 Illumina 测序平台的高通量测序技术, 对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼肠道及其养殖水体、生物饵料中细菌种类及丰度进行研究。测序结果显示, 养殖水体、生物饵料和大菱鲆幼鱼肠道等 19 个样品共获得有效序列 547621 条, 可聚类于 3771 个可分类操作单元(OTUs), 归属于养殖水体、生物饵料、健康幼鱼和发病幼鱼的操作分类单元(OTU)个数分别为 3038、1090、87 和 777, 其中, 健康幼鱼与生物饵料、健康幼鱼与养殖水体特有的 OTU 个数分别为 57 和 0, 发病幼鱼与生物饵料、发病幼鱼与养殖水体特有的 OTU 个数分别为 481 和 31。表明幼鱼肠道微生物多样性与生物饵料密切相关。根据细菌注释结果, 拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)在大菱鲆幼鱼肠道中占优势地位, 其中, 健康幼鱼肠道微生物共聚类为 8 个门, 发病幼鱼的肠道微生物可聚类为 19 个门。与健康幼鱼相比, 发病幼鱼肠道门水平上的 3 种主要优势菌群落结构出现失衡。此外, 对各样品中丰度最高的 100 位 OTU 分析显示, 幼鱼肠道优势菌种类与生物饵料中的优势菌种类密切相关, 而每个发病幼鱼肠道优势菌种类具有一定的独立性。本研究旨在为大菱鲆健康养殖和微生态调控提供实验依据。

关键词 生物多样性; 高通量测序; 大菱鲆

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)04-0084-11

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)属于比目鱼类, 在我国市场上称为“多宝鱼”。野生大菱鲆生活于冰岛与摩洛哥附近的欧洲海域(Blanquer *et al*, 1992), 是一种具有耐低温、生长快等特点的大型底栖经济鱼类。近年来, 由于缺乏抗病大菱鲆良种选育, 腹水症成为苗种培育期间的多发病, 对大菱鲆养殖业造成了严重

影响。腹水症病原学的初步研究认为, 细菌是导致腹水症发生的主要原因(景亚运等, 2016)。但多年来, 研究人员对大菱鲆腹水症的致病菌的研究表明, 导致大菱鲆发生腹水症的致病菌却不尽相同, 如迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)(李筠等, 2016)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)(张晓君等, 2006)、灿烂弧菌

* 山东省农业良种工程项目“泰山学者种业计划专家项目”(ZR2014CQ001)和山东省农业良种工程项目“大菱鲆种质资源精准鉴定与选种育种创新利用-子课题”(2016LZGC031-2)共同资助 [This work was supported by Taishan Scholar Program for Seed Industry (ZR2014CQ001), and Accurate Identification and Selection Breeding Creative Utilization of Turbot Germplasm Resources (2016LZGC031-2)]. 吴欢欢, E-mail: 17664080328@163.com

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-05-07, 收修改稿日期: 2018-07-09

(*Vibrio splendidus*)(Thomson *et al.*, 2005)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)(Austin *et al.*, 2006)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(张伟妮, 2006)等, 腹水症这一特征给该病的诊断和防治造成了困难。有学者利用限制性片段长度多态性分析(RFLP)研究大菱鲂肠道微生物多样性(邢孟欣等, 2014), 但这种传统方法获得的生物信息较少, 具有一定的局限性, 只能对少数主要的优势微生物进行分析(王贤丰等, 2017), 难以全面解析微生物的组成结构。

高通量测序技术是一种能够对上百万个脱氧核苷酸链同时进行测序的第 2 代技术。目前, 基于细菌 16S rDNA 扩增子测序的高通量测序技术成为研究样本生境内环境微生物菌群结构的重要手段, 在水环境(窦妍等, 2016)、土壤(Ligi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016)、空气(李红梅等, 2015)、口腔(Pozhitkov *et al.*, 2011)和植物生境(陈泽斌等, 2016)等方向得到了广泛应用, 全面解析样品生境内的微生物组成和数量。

本研究基于 Illumina 测序平台的高通量测序技术对山东某大菱鲂养殖场育苗期的养殖水环境、蓄水池中自然海水、生物开口饵料和健康与自然患腹水症的幼鱼样品进行研究, 分析暴发腹水症期间投喂的生物饵料、养殖水体和幼鱼肠道的生物环境内的微生物组成及数量变化, 以期更深入了解大菱鲂育苗肠道及养殖环境群落结构, 为大菱鲂健康养殖和微生态调控提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于 2017 年 4 月下旬在山东某养殖场应用工厂化海水半循环养殖系统进行大菱鲂家系苗种培育。苗种培育初期(5 月下旬)育苗车间开始流行腹水症, 期间收集了幼鱼(Group_Fish)、生物饵料(Group_Baits)和养殖水体(Group_Water) 3 类样品。幼鱼分为健康幼鱼组(Group_E)和发病幼鱼组(Group_F), 每组 3 尾; 生物饵料有来自渤海湾的金海湾小卤虫(*Artemia salina*)和无棣小卤虫(*Artemia salina*)、来自西藏的大卤虫(*Artemia salina*)、轮虫(*Rotifer*)、小球藻(*Chlorella*)和裂壶藻(*Schizochytrium*), 每种饵料 1 个样品; 养殖水体可分为蓄水池自然海水(Group_B)、健康幼鱼养殖水体(Group_C)和发病幼鱼养殖水体(Group_D), 其中, 自然海水 1 个, 养殖水体各 3 个。

1.2 实验方法

1.2.1 样品收集

生物饵料中收集的卤虫和轮虫

均由卵孵化去壳收集得到; 小球藻和裂壶藻为公司培养收集得到; 水样是利用隔膜真空泵抽滤 2 L 水体过 0.22 μm 孔径的醋酸纤维滤膜得到的。

1.2.2 DNA 的提取 水环境 DNA 使用天根土壤 DNA 提取试剂盒(TIANamp Soil DNA Kit)提取, 具体操作参照试剂盒说明书; 其余样品 DNA 采用酚-氯仿法提取。

1.2.3 高通量测序方法 利用细菌通用引物 343F: 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'/798R: 5'-CCGTCAATT-CMTTTRAGTTT-3'对细菌的 16S rDNA 的 V3-V4 区进行 PCR 扩增, 送诺和致源生物公司进行基于 Illumina 平台的高通量测序。

1.2.4 生信分析 对下机后的原始数据(Raw reads)进行双端去杂、拼接和去嵌合体等质控处理, 获得优质的有效序列(Valid tags)。应用 VSEARCH(v2.4.2)软件, 对 Valid tags 依照 97%的相似度聚类成为可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU), 而后选取每个归类单元中丰度最高的序列作为该单元的代表序列(Edgar, 2010), 并与 Silva 的 SSU rRNA 数据库序列信息比对, 获得生物注释。最后对各样品 OTU 进行丰度、 α -多样性、 β -多样性以及各分类水平上的细菌群落结构比较分析, 来探究饵料和养殖水体对大菱鲂幼苗生物多样性的影响。

2 结果与分析

2.1 高通量数据统计

19 个样品所测的原始序列经去杂、拼接等质控处理共得 Clean tags 722213 条, 然后再去除嵌合体, 共获得有效序列 547621 条, 占 Clean_tags 的 75.83%; 使用 VSEARCH (v2.4.2)软件, 对有效序列按照 97%的相似度共聚类为 3771 个 OTUs。

生物饵料中海大小卤虫(B1)、无棣小卤虫(B2)、无棣大卤虫(B3)、轮虫(B4)、小球藻(B5)和裂壶藻(B6)分别获得的 OTU 个数为 90、743、50、258、277 和 111, 去重复后饵料组共得 1090 个 OTUs。水体组共获得 3080 个 OTUs。其中, 自然海水的 OTU 个数为 2124, 3 个检测的健康幼鱼养殖水体的 OTU 个数分别为 1899、1806 和 1013, 去重复后健康幼鱼养殖水体组共获得 2464 个 OTUs, 3 个检测的发病幼鱼养殖水体的 OTU 个数分别为 520、1374 和 1320, 去重复后发病幼鱼养殖水体组共获得 1560 个 OTUs。幼鱼组共获得 785 个 OTUs。其中, 3 尾健康幼鱼的 OTU 个数分别为 44、51 和 75, 去重复后健康幼鱼组共获得

87个 OTUs, 3尾发病幼鱼的 OTU 个数分别为 219、634 和 41, 去重复后发病幼鱼组共获得 777 个 OTUs。

根据各样品 OTU 信息, 对各样品组进行统计如表 1 所示。

表 1 各组 OTU 统计分析
Tab.1 Statistical analysis of OTUs in different groups

组别 Group	饵料组 Group_Baits	水体组 Group_Water			幼鱼组 Group_Fish	
		海水 Group_B	健康幼鱼养殖水体 Group_C	发病幼鱼养殖水体 Group_D	健康幼鱼 Group_E	发病幼鱼 Group_F
OTU 统计		2124	2464	1560	87	777
OTU_counts	1090		3038		785	

2.2 自然海水组、健康幼鱼组、发病幼鱼组和饵料组的 OTU Venn 图分析

OTU 的数目可以代表物种的丰富程度(Zhang *et al.*, 2009)。为探究养殖水体、饵料对幼鱼生境内生物多样性的影响程度, 对自然海水组、健康幼鱼组、发病幼鱼组和饵料组的 OTU 进行 Venn 图分析(图 1)。

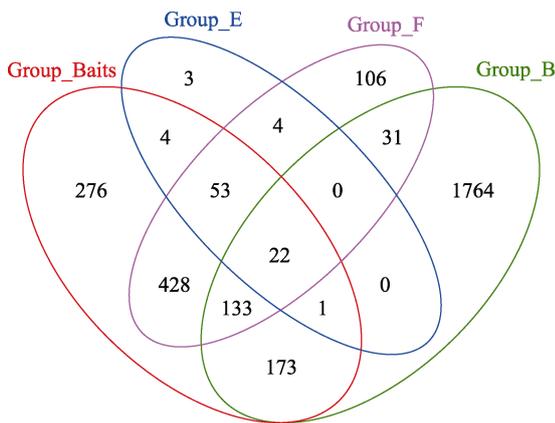


图 1 各组韦恩图

Fig.1 Venn diagram of groups

Group_B: 自然海水组; Group_E: 健康幼鱼组; Group_F: 发病幼鱼组; Group_Baits: 生物饵料组

Group_B: Natural sea water; Group_E: Healthy juvenile fish; Group_F: Diseased juvenile fish; Group_Baits: Living baits

Group_E 和 Group_F: Group_E(健康幼鱼组)和 Group_F(发病幼鱼组)的 OTU 个数分别为 87 和 777, 共有的 OTU 个数为 79 个, 分别占各自组 OTU 数目的 90.80%和 10.17%。

Group_Water: 自然海水组(Group_B)的 OTU 个数为 2124, 健康养殖水体组(Group_C)的 OTU 个数为 2464, 发病养殖水体组(Group_D)的 OTU 数有所降低, 为 1560, Group_Water 总 OTU 数为 3038 个。其中, 健康养殖水体组(Group_C)与自然海水组(Group_B)共有的 OTU 数为 1702 个, 占自然海水组总数的 80.13%; 而发病养殖水体组与自然海水组共

有的 OTU 个数为 681 个, 占自然海水组 OTU 总数的 32.06%。

Group_E、Group_B 和 Group_Baits: 3 组共有的 OTU 数目为 23 个。其中, Group_E 与 Group_Baits 共有的 OTU 数为 80 个, 特有的 OTU 数为 57 个, 分别占 Group_E OTU 数的 91.95%和 65.52%; Group_E 与 Group_B 共有的 OTU 数为 23 个, 特有的 OTU 数为 0, 分别占 Group_E OTU 数的 26.44%和 0。

Group_F、Group_B 和 Group_Baits: 3 组共有的 OTU 数目为 155 个。其中, Group_F 与 Group_Baits 共有的 OTU 数为 636 个, 特有的 OTU 为 481 个, 分别占 Group_F OTU 数的 81.85%和 61.90%; Group_F 与 Group_B 共有的 OTU 数为 186 个, 特有的 OTU 为 31 个, 分别占 Group_E OTU 数的 23.94%和 3.99%。

2.3 微生物多样性分析

2.3.1 生境内多样性(α -Diversity)分析 使用软件 Qiime 计算各样本均一化处理后 OTU 数据的 Goods coverages、Chao1 和 Simpson 指数(表 2), 分别表征数据的测序深度、OTU 丰富度和群落多样性。所有样品的 Good's coverages 指数范围为 0.93~1.00。基于 Chao1 指数绘制的稀释曲线如图 2 所示, 随着抽样数的增加, 各样品稀释曲线斜率均逐渐降低, 后期曲线趋于平缓, Chao1 指数基本与测序获得的 OTU 数目一致, 说明在当前的测序深度下, 得到的测序数据量可以代表样本中的细菌信息。Group_Baits、Group_Water 和 Group_Fish 的 Simpson 指数分别为 0.83 ± 0.094 、 0.95 ± 0.035 和 0.82 ± 0.12 , 利用 SPSS 18.0 软件对 Simpson 指数进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 显示 Group_Water 的微生物多样性程度均显著高于 Group_Baits 和 Group_Fish 两组($P < 0.05$)。

2.3.2 生境间多样性(β -Diversity)分析 微生物群落聚类分析根据样本相似性进行非加权组平均法(Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)分析, 采用 Jackknifed 重复抽样对 UPGMA

表 2 各样品 α 多样性指数
Tab.2 α -Diversity indices of each sample

样品 Sample	样品编号 Sample ID	α 多样性指数 α -Diversity indices		
		Good's coverage	Chao1	Simpson
金海湾小卤虫 <i>Artemia salina</i> in Jinhaiwan	B1	1.00	88.25	0.75
无棣小卤虫 <i>Artemia salina</i> in Wudi	B2	0.97	753.12	0.98
西藏大卤虫 <i>Artemia salina</i> in Tibet	B3	1.00	34.60	0.73
轮虫 <i>Rotifer</i>	B4	0.99	245.94	0.89
小球藻 <i>Chlorella</i>	B5	0.99	249.73	0.82
裂壶藻 <i>Schizochytrium</i>	B6	1.00	116.75	0.79
蓄水池自然海水 Sea water	W18	0.91	2013.70	0.97
健康幼鱼养殖水体 Aquaculture water of healthy juvenile fish	W16.1	0.93	1723.52	0.99
	W16.2	0.93	1729.30	0.98
	W16.3	0.96	977.22	0.93
发病幼鱼养殖水体 Aquaculture water of diseased juvenile fish	W17.1	0.98	452.53	0.89
	W17.2	0.95	1232.16	0.97
	W17.3	0.95	1233.65	0.96
健康幼鱼 Healthy juvenile fish	F14.1	1.00	39.00	0.74
	F14.2	1.00	67.00	0.75
	F14.3	1.00	86.00	0.74
发病幼鱼 Diseased juvenile fish	F15.1	1.00	259.07	0.96
	F15.2	0.98	646.17	0.98
	F15.3	1.00	35.33	0.74

的可靠性进行检验(图 3)。结果显示, 75%~100%可信度认为水体组中的各样本单独聚为一支; 50%~75%可信度认为饵料组中 B2、B4 和 B5 与发病幼鱼组中 F15.1 和 F15.2 聚为一支; 75%~100%可信度认为饵料组中的 B1、B3 和 B6、发病幼鱼组中 F15.3 与健康幼鱼组所有样品聚为一支。

利用主成分分析(PCA, Principal component analysis)对反应样本差异的 OTU 组成进行方差剖分, 降维成 2 个反映方差的 2 个特征值, 并以此作为二维坐标 PCA 图的横纵坐标, 基于 Unifrac 距离进行 PCA 分析。从图 4 可明显看出, 所有样品大致聚为 5 簇: 饵料与鱼体组(Group_Baits、Group_E and Group_F) 2 簇, 自然海水组(Group_B)、健康养殖水体组(Group_C)、

发病养殖水体组(Group_D)各一簇。Group_Baits、Group_C 和 Group_D 大部分样品均重叠在一簇。

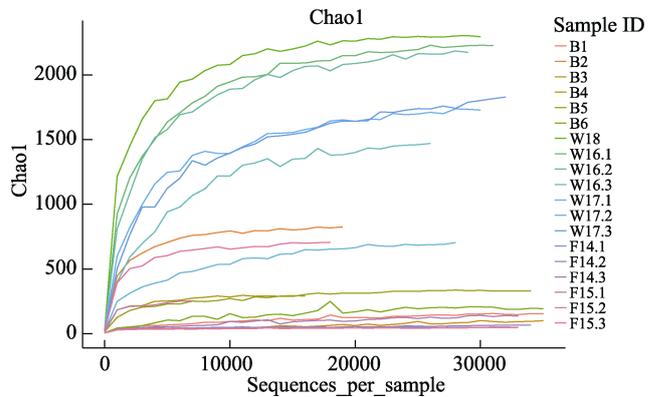


图 2 基于 Chao1 指数的稀释曲线

Fig.2 The dilution curve based on the Chao1 index

B1: 金海湾小鲁虫; B2: 无棣小鲁虫; B3: 西藏大鲁虫; B4: 轮虫; B5: 小球藻; B6: 裂弧藻; W18: 自然海水; W16: 健康幼鱼养殖水体; W17: 发病幼鱼养殖水体; F14: 健康幼鱼; F15: 发病幼鱼。同图 3、图 5 和图 6
B1: *Artemia salina* in Jinhaiwan; B2: *Artemia salina* in Wudi; B3: *Artemia salina* in Tibet; B4: *Rotifer*; B5: *Chlorella*; B6: *Schizochytrium*; W18: Sea water; W16: Aquaculture water of healthy juvenile fish; W17: Aquaculture water of diseased juvenile fish; F14: Healthy juvenile fish; F15: Diseased juvenile fish. The same as in Fig.3, Fig.5, and Fig.6

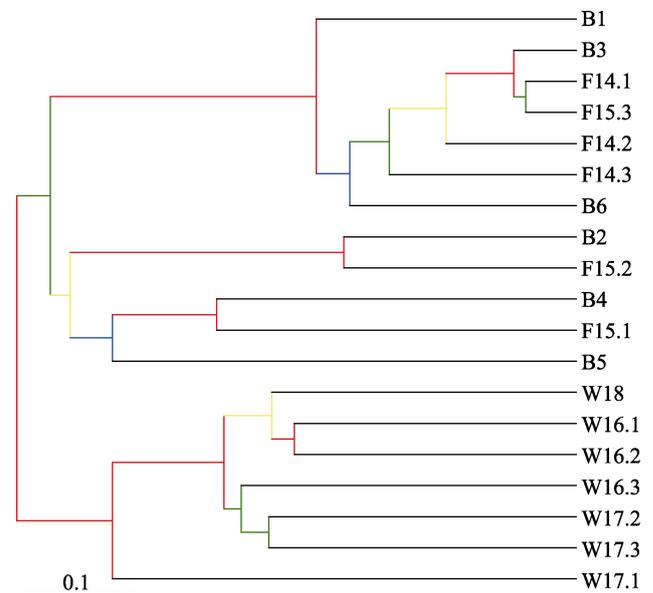


图 3 UPGMA 聚类分析及可信度检验

Fig.3 UPGMA cluster analysis and reliability test

红色、黄色、绿色、蓝色分别代表 UPGMA 分析可信度的 75%~100%、50%~75%、25%~50%和 25%
Red, yellow, green, and blue represent 75%~100%, 50%~75%, 25%~50% and 25% of UPGMA analysis reliability

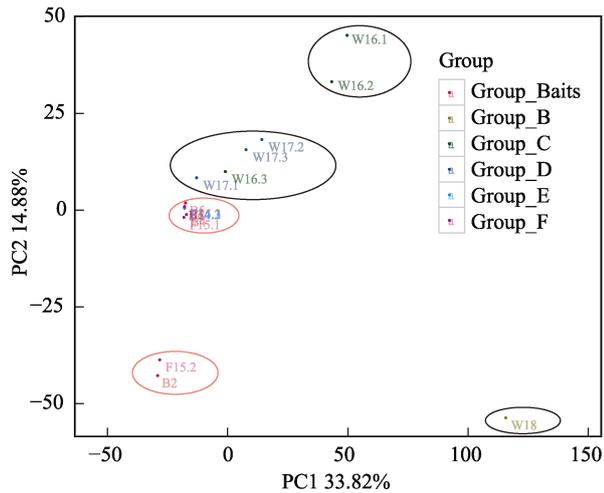


图4 主成分分析

Fig.4 Principal component analysis (PCA)

Group_B: 自然海水组; Group_C: 健康幼鱼养殖水体;
Group_D: 发病幼鱼养殖水体; Group_E: 健康幼鱼组;
Group_F: 发病幼鱼组; Group_Baits: 生物饵料组

Group_B: Natural sea water; Group_C: Sea water of healthy juvenile fish; Group_D: Sea water of diseased juvenile fish; Group_E: Healthy juvenile fish; Group_F: Diseased juvenile fish; Group_Baits: Living baits

2.3.3 门、科、属三种分类水平下的群落结构分析

根据注释结果,所有样本在本次测序中检测的微生物有细菌和古细菌,其中,细菌归于37个门、100个纲、225个目、459个科和959个属。

在门水平上,纤维杆菌门(Fibrobacteres)、迷踪菌门(Elusimicrobia)、黏胶球菌门(Lentisphaerae)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、Latescibacteria、Cloacimonetes、Aminicenantes、装甲菌门(Armatimonadetes)、Saccharibacteria、衣原体门(Chlamydiae)、螺旋菌门(Spirochaetae)、Synergistetes、Candidate_division_SR1、Marinimicrobia_(SAR406_clade)、TM6、PAUC34f、JL_ETNP_Z39、GOUTA4、SHA_109、WCHB1_60和TA06等22个门细菌含量较低,占比不足细菌总量的1%;酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿菌门(Chlorobi)、蓝藻门(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacter)、厚壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽孢单菌门(Gemmatimonades)、Gracilibacteria、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、Parcubacteria、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)和柔膜菌门(Tenericutes)等15个优势门占细菌总量的97.09%以上。

15个优势菌门的菌群结构如图5所示,鱼体组中细菌在门水平上的菌群结构差异不大,占比前3的优势门为拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门,与饵料生物的门类细菌组成及其比例较为相似。经统计,健康幼鱼组共检测出8个门,占比前3的优势菌门比例依次为51.84%±0.63%、26.17%±0.84%和15.11%±0.40%,标准差均小于1%,表明健康幼鱼的菌群结构非常稳

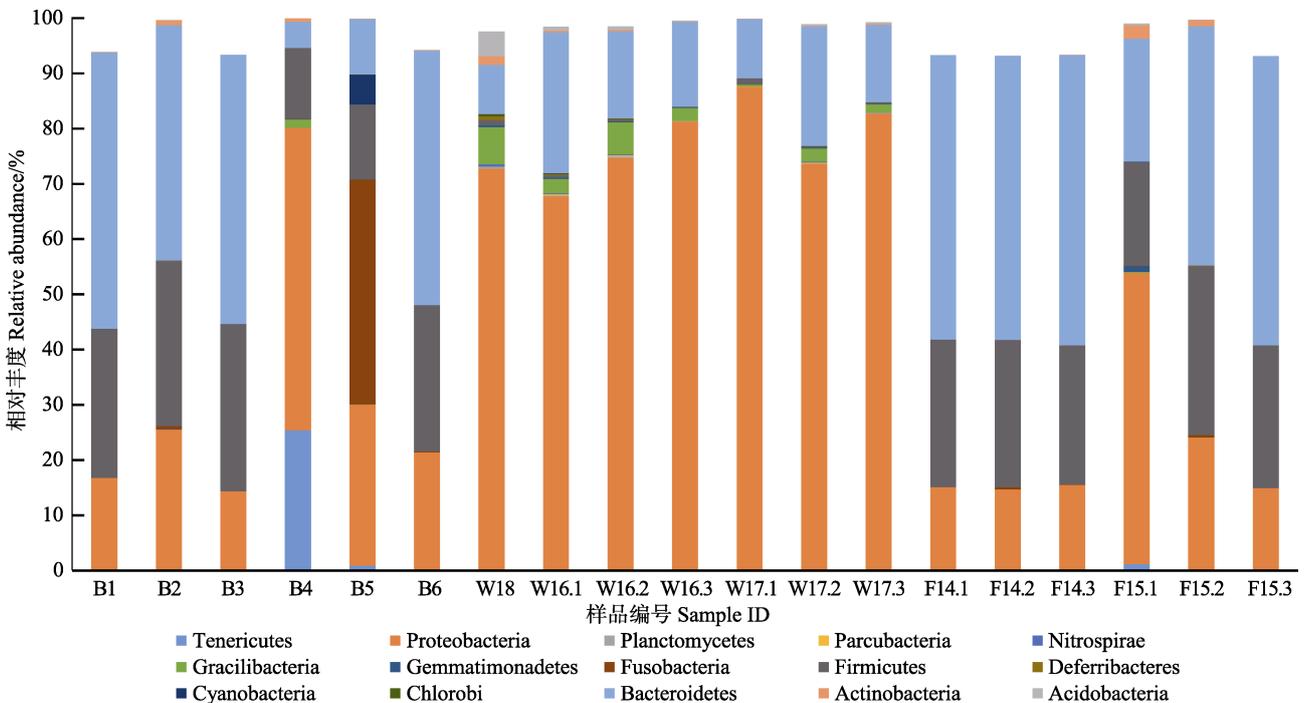


图5 各样品门水平下细菌相对丰度

Fig.5 Relative abundance at phylum level of bacterial communities of samples

定;发病幼鱼组共检测到的细菌门数为19个,3种优势菌门的比例范围依次为22.31%~52.31%、18.77%~30.53%和14.93%~52.77%,组内比例波动较大。

基于OTU注释结果,丰度较高的15个优势菌科分别为弧菌科(Vibrionaceae)、Rhodobacteraceae、假交替单胞菌科(Pseudoalteromonadaceae)、紫单胞菌科(Porphryomonadaceae)、海洋螺菌科(Oceanospirillaceae)、支原体(Mycoplasmataceae)、毛螺菌科(Lachnospiraceae)、梭杆菌科(Fusobacteriaceae)、Flavobacteriaceae、科尔韦氏菌科(Colwelliaceae)、拟杆菌目某科(Bacteroidales_S24_7_group)、拟杆菌科(Bacteroidaceae)、交替单胞菌科(Alteromonadaceae)、产碱杆菌科(Alcaligenaceae)和肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。菌群结构如图6所示,15个科包含的细菌占总细菌含量的67.95%,样品间科水平的种类和细菌量各不相同。健康幼鱼组(Group_E)共检测出7个科,其中,至少在2个重复样品都检测到的科为6个,分别为紫单胞菌科(51.64%±0.56%)、毛螺菌科(23.82%±1.03%)、产碱杆菌科(12.20%±0.32%)、肠杆菌科(2.89%±0.28%)、拟杆菌科(0.031%±0.019%)和拟杆菌目某科(0.022%±0.0097%),其6个科的细菌量占总细菌量的(90.59%±1.09%),与饵料组B1、B3和B6的菌群结构较为相似。与健康幼鱼组(Group_E)相比,发病幼鱼组(Group_F)组内菌属多样性和菌群结构差异均较大,F15.3菌群结构与健康幼鱼较为相似,而F15.1和F15.2中紫单胞菌科(2.71%±1.89%)、毛螺菌科(7.13%±5.12%)和产碱杆菌科(0.51%±0.10%)的细菌比重显著低于健康幼鱼组,肠杆菌科(18.81%±2.41%)、拟杆菌科(11.78%±13.58%)

和拟杆菌目某科(13.27%±4.29%)的细菌比重显著高于健康幼鱼组;除此之外,还有9个科只存在于发病幼鱼组,其中,至少在2个重复样品检测到的科有5个,分别为弧菌科(1.10%±0.11%)、Rhodobacteraceae(0.22%±0.30%)、支原体(0.48%±0.67%)、梭杆菌科(0.05%±0.03%)和Flavobacteriaceae(0.10%±0.13%)。

在属水平上,19个样品中细菌丰度最高的15个属分别为副杆菌属(*Parabacteroides*)、*Lachnoclostridium*、*Parasutterella*、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、大肠志贺氏杆菌属(*Escherichia shigella*)、嗜冷菌属(*Psychrilyobacter*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、科尔韦氏菌属(*Colwellia*)、*Ruegeria*、*Olleya*、弧菌属(*Vibrio*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、*Methylophaga*、冷杆菌属(*Psychrobacter*)、*Reinekea*。

15种优势菌属在各样品中的菌群分布及结构特征见图7,健康幼鱼组组内属水平菌群结构稳定,含有5个菌属,分别为副杆菌属(59.13%±0.77%)、*Lachnoclostridium*(25.03%±0.84%)、*Parasutterella*(13.97%±0.21%)、假交替单胞菌属(1.83%±0.18%)和拟杆菌属(0.036%±0.022%)。与健康幼鱼组相比,发病幼鱼组组内菌属多样性和菌群结构差异均较大,F15.3菌群结构与健康幼鱼较为相似,而F15.1和F15.2中的副杆菌属(2.57%±1.70%)、*Lachnoclostridium*(0.88%±0.42%)和*Parasutterella*(0.19%±0.12%)的细菌比重显著低于健康幼鱼组,拟杆菌属(13.27%±4.29%)和大肠志贺氏杆菌属(8.50%±2.11%)的细菌比重显著低于健康幼鱼组,除此之外,还有6个属只存在于发病幼鱼组,至少在2个重复样品都检测到的属有4个,分别为弧

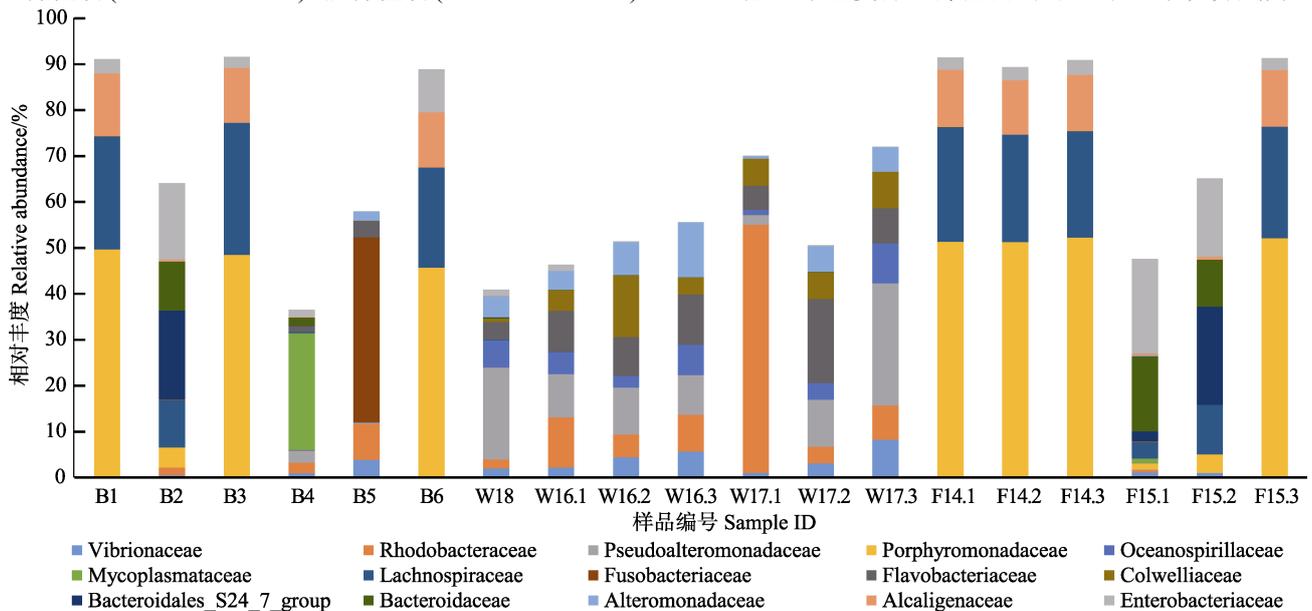


图6 各样品科水平下细菌相对丰度

Fig.6 Relative abundance at phylum level of bacterial communities of samples

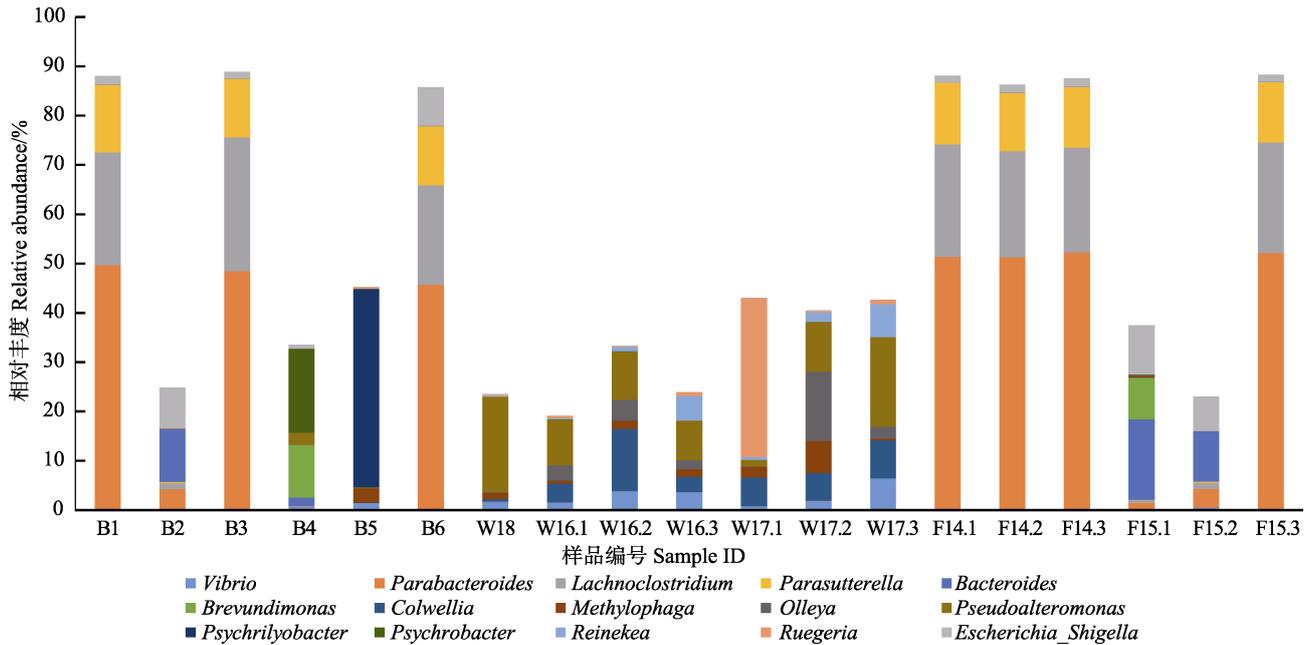


图7 各样品属水平下细菌相对丰度

Fig.7 Relative abundance at genus level of bacterial communities of samples

菌属(0.31%±0.35%)、短波单胞菌属(4.25%±5.97%)、*Olleya*(0.03%±0.04%)和冷杆菌属(0.01%±0.01%)。

2.3.4 丰度 Top100 的微生物的系统进化树分析

对OTU的丰度进行统计,选出丰度最高的100个OTU构建系统进化树,并以热图形式展示OTU在不同样品中的分布(图8)。经统计,这100条reads共归于6个门:变形菌门(63.54%)、拟杆菌门(21.88%)、厚壁菌门(8.33%)、梭杆菌门(1.56%)、蓝细菌门(1.56%)和Gracilibacteria(3.13%)。由图8可知,编号为F14.1、F14.2和F14.3的健康幼鱼和编号为F15.3的发病幼鱼与饵料组所属的金海湾小卤虫(B1)、西藏大卤虫(B3)和裂壶藻(B6)的高丰度OTU一致,主要为副杆菌属(*Parabacteroides*)、*Parasutterella*属、布劳特氏菌属(*Blautia*)、*Lachnoclostridium*属、梭菌目(Clostridiales)和奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)等细菌。

编号为F15.1和F15.2的2条病鱼与生物饵料中无棣小卤虫(B2)、轮虫(B4)和小球藻(B5)中的高丰度OTU一致,主要为拟杆菌属(*Bacteroides*)、拟杆菌目某科(*Bacteroidales_S24_7_group*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、大肠志贺氏杆菌属(*Escherichia_shigella*)和奇异变形杆菌。

3 讨论

本研究利用Illumina Miseq平台对山东某育苗场

暴发腹水症的30日龄大菱鲂幼苗及同期健康的幼苗、自然海水、养殖水体和生物饵料等共计19个样品内的细菌16S rDNA进行了高通量测序,所有样品OTU的Good's coverages指数范围在0.93~1.00之间,说明测序深度足够大,数据可以全面解读各样品中细菌的组成及丰度,可以反映绝大多数的微生物信息。

对Simpson指数的计算可知,幼鱼、生物饵料和养殖水体的细菌丰度和多样性依次升高。有关半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)(张正等,2015)和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)(孙振丽等,2016)的研究结果与本研究结果一致,即养殖水体的微生物多样性比动物的肠道微生物多样性高。健康幼鱼和发病幼鱼共有的OTU分别占各自OTU总数的90.80%和10.17%。这说明健康的大菱鲂和发生腹水的大菱鲂肠道细菌多样性存在较大的差异,发病幼鱼会受到外界细菌的侵袭。为了溯源大菱鲂幼鱼肠道微生物,基于OTU对生物饵料、自然海水、健康幼鱼和发病幼鱼进行Venn图分析(图1),显示健康幼鱼和发病幼鱼分别与生物饵料共有的OTU个数为80和636,分别占幼鱼OTU总数的91.95%和81.85%。有研究认为,养殖环境中的微生物能够影响养殖动物肠道内的微生物多样性(Li et al, 2012),丰度较低的某些细菌会定植到鱼体肠道(Navarrete et al, 2009)。由此可知,水体的微生物多样性非常高,自然海水OUT的数目达到2124个,但其与健康幼鱼特有的OTU数为0,即使是与发病幼鱼特有的OTU数也仅为31。由此推测,在大菱鲂

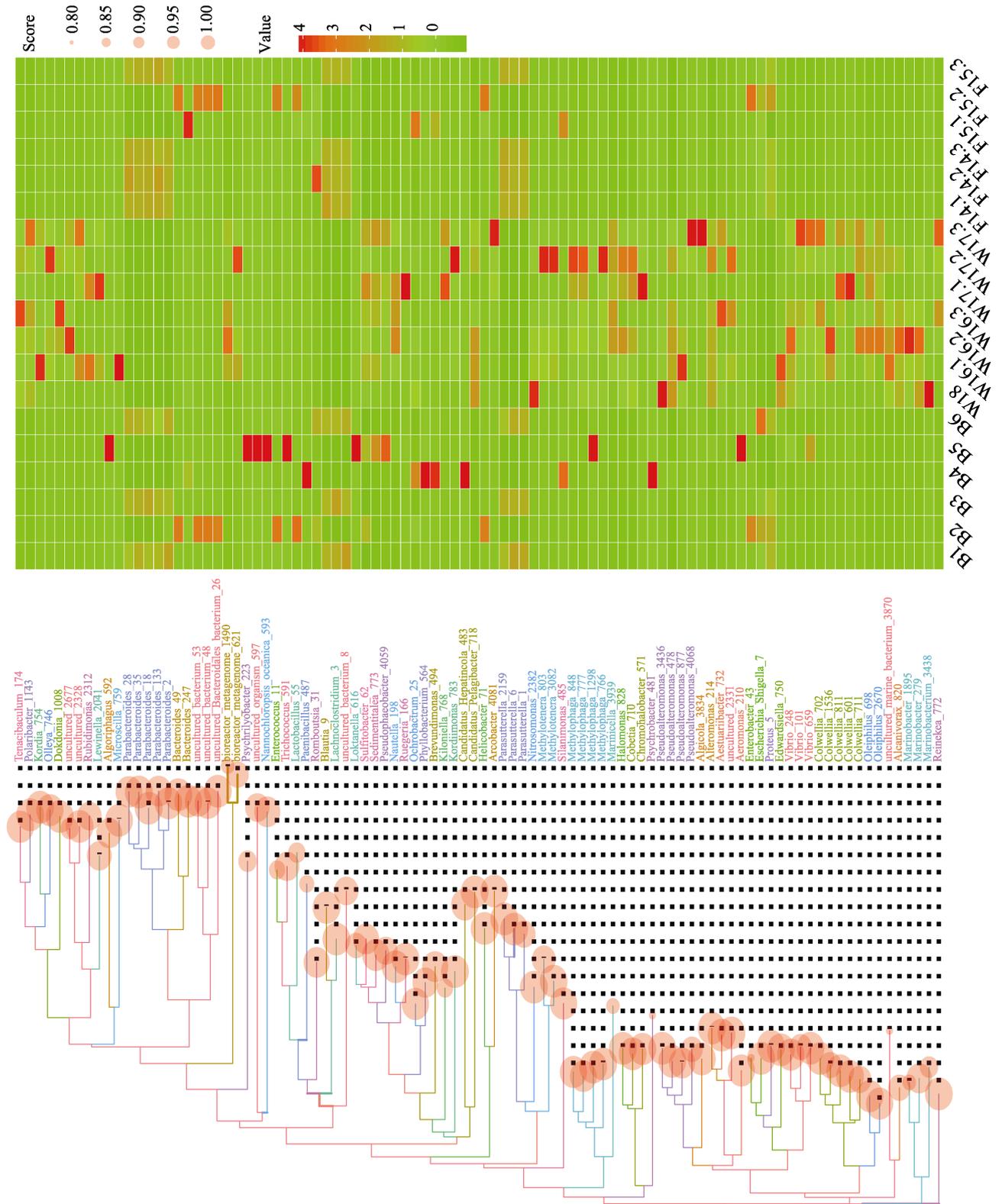


图 8 基于丰度最高的 100 个 OTU 的系统进化树及其在各样品中的分布热图

Fig.8 The phylogenetic tree based on the top 100 OTU and its heat map in each sample

B1: 金海湾小鲁虫; B2: 无棣小鲁虫; B3: 西藏大鲁虫; B4: 轮虫; B5: 小球藻; B6: 裂弧藻; W18: 自然海水; W16: 健康幼鱼养殖水体; W17: 发病幼鱼养殖水体; F14: 健康幼鱼; F15: 发病幼鱼

B1: *Artemia salina* in Jinhaiwan; B2: *Artemia salina* in Wudi; B3: *Artemia salina* in Tibet; B4: *Rotifer*; B5: *Chlorella*; B6: *Schizochytrium*; W18: Sea water; W16: Aquaculture water of healthy juvenile fish; W17: Aquaculture water of diseased juvenile fish; F14: Healthy juvenile fish; F15: Diseased juvenile fish

肠道微生物群落结构形成初期,生物饵料发挥了关键的作用。根据 OTU 注释结果,健康幼鱼的肠道微生物共聚类为 8 个门,发病幼鱼的肠道微生物可聚类为 19 个门。经统计,发病幼鱼组增加的 11 个门类细菌丰度均较小,细菌总量仅占 $3.91\% \pm 2.57\%$,如酸杆菌门、放线菌门、蓝藻门、Saccharibacteria 门和螺旋藻门等。说明当幼鱼发病时,饵料中某些丰度较低的细菌会趁机植入肠道。

根据细菌分类结果,拟杆菌门、厚壁菌门和变形菌门在大菱鲆幼鱼肠道中占优势地位。有学者研究了体长 6 cm 大菱鲆幼鱼(朱鹏飞, 2015)和体重 700 g 大菱鲆成鱼(邢孟欣等, 2014)的肠道菌群,显示变形菌门细菌是丰度最高的门类。而本研究对 30 日龄(体长为 1 cm)健康幼鱼的肠道菌群研究结果显示,拟杆菌门是主要优势菌门,占细菌总量的 50%以上;其中,变形菌门细菌仅占 $15.11\% \pm 0.40\%$ 。值得注意的是,与健康幼鱼相比,发病幼鱼中变形菌门的细菌丰度明显提高($30.56\% \pm 19.76\%$)。变形菌门因其细菌形态多样而得名,是细菌中最大的一个门,主要包括 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、 δ -变形菌纲和 ϵ -变形菌纲,近年又确立一个 ζ -变形菌纲(Emerson *et al.*, 2007)。本研究发现, β -变形菌纲、伯克氏菌目、产碱杆菌科、*Parasutterella* 属中的 4 种未知菌种广泛存在于健康大菱鲆幼苗体内,该属 reads 总数为 12471 条,占健康幼鱼体内变形菌纲细菌总量的 80.79%。*Parasutterella* 属细菌首次是从健康的人类粪便中分离出来(Nagai *et al.*, 2009)。*Parasutterella* 属的细菌是否参与大菱鲆幼苗正常的肠道代谢活动,还有待进一步研究。与健康幼鱼相比,发病幼鱼 β -变形菌纲占比明显降低,仅占 33.62%。

γ -变形菌纲是目前已知细菌种类最多的一个纲,包含许多能引起人类致病的细菌,如沙门氏菌属(*Salmonella*)能造成人类伤寒和肠炎。注释结果发现,健康幼鱼肠道含有的 γ -变形菌纲的细菌较为单一,全部属于肠杆菌目肠杆菌科,占健康幼鱼变形菌纲细菌总数的 19.12%;而发病幼鱼肠道中 γ -变形菌纲的细菌较为多样,主要有肠杆菌目、交替单胞菌目(Alteromonadales)、Cellvibrionales 目、着色菌目(Chromatiales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、咸水球星菌目(Salinisphaerales)、硫发菌目(Thiotrichales)、弧菌目(Vibrionales)和黄色单胞菌目(Xanthomonadales)等,细菌丰度显著提高,占发病幼鱼变形菌纲细菌总数的 51.19%。其中,肠杆菌科、假交替单胞菌目和弧菌目含有许多的致病菌。

对所有样品(饵料、水体和幼鱼)中丰度较高的

100 个 OTU 进行进化树-热图分析发现(图 8),健康幼鱼肠道中高丰度菌属在饵料中的产自渤海的金海湾小卤虫、产自西藏的大卤虫和裂壶藻中含量颇丰。这些菌属中大多属于环境或动物肠道正常菌群,除了少量奇异变形杆菌。奇异变形杆菌属于肠杆菌科,是一种条件致病菌,能引起大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)体表溃烂(张庆华等, 2005)、棘胸蛙(*Rana spinosa*)烂皮病(王瑞君等, 2012)和中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)腮腺炎病(林亚歌等, 2104)等多种水产动物疾病。从图 8 也可看出,该菌在发病幼鱼生境内检测量有所提高。其次,发病幼鱼生境内高丰度菌属在饵料中的产自渤海的无棣小卤虫、轮虫和小球藻中颇丰。这些菌属中除了环境中广泛存在的化能自养类细菌和奇异变形杆菌外,还有一种致病菌属——大肠志贺氏杆菌属。大肠志贺氏杆菌属是一种肠道感染致病菌(刘蔚等, 1999),能引起人类痢疾(刘汉明, 1991)。而 3 种商品化卤虫和裂壶藻中大肠志贺氏杆菌属和奇异变形杆菌的含量都极其丰富。在生产上,卤虫需要摄食裂壶藻进行营养强化,然后才作为饵料投喂幼鱼,而裂壶藻和 3 种卤虫在门水平的菌群结构均较为相似,故推测鱼体内的大肠志贺氏杆菌属和奇异变形杆菌均来自裂壶藻。从细菌进化地位来说,大肠志贺氏杆菌属、奇异变形杆菌与迟缓爱德华氏菌同属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae),而肠杆菌科除菊花欧文氏菌都含有肠杆菌科共同抗原(何晓青, 1980)。由此可知,发病大菱鲆幼鱼肠道除了增加许多的有害菌群外,其肠道含量较低的致病菌也存在丰度升高现象。

4 小结

本研究利用高通量测序技术对暴发腹水症的大菱鲆幼苗及其养殖环境的微生物多样性进行了研究。结果显示,生物饵料中的微生物参与大菱鲆幼鱼肠道早期菌群的形成,并起主要作用,也会引起发病幼鱼肠道有害菌群大量滋生。因此,为了有效预防大菱鲆幼鱼疾病的暴发,在育苗过程中,应规范养殖,减少应激,并加强开口饵料中病原菌的检查及防控力度。

参 考 文 献

- Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119-124
- Blanquer A, Alayse JP, Berrada-Rkhami O, *et al.* Allozyme variation in turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Osteichthyes, Pleuronectoformes, Scophthalmidae) throughout their range in Europe. *Journal of Fish Biology*,

- 1992, 41(5): 725–736
- Chen ZB, Li B, Wang ZB, *et al.* Study on the diversity of endophytic bacteria in Maize using Illumina MiSeq high-throughput sequencing system. *Modern Food Science and Technology*, 2016(2): 113–120 [陈泽斌, 李冰, 王定康, 等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析玉米内生细菌多样性. *现代食品科技*, 2016(2): 113–120]
- Dou Y, Zhao XW, Ding J, *et al.* Application of high-throughput sequencing for analyzing bacterial communities in earthen ponds of sea cucumber aquaculture in northern China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 122–129 [窦妍, 赵晓伟, 丁君, 等. 应用高通量测序技术分析北方刺参养殖池塘环境菌群结构. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 122–129]
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460
- Emerson D, Rentz JA, Lilburn TG, *et al.* A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS One*, 2007, 2(7): e667
- He XQ. Sanitary inspection (bacterial examination) (second volume). Health and epidemic prevention station in Jiangxi Province, 1980 [何晓青. 卫生防疫检验(细菌检验)(下册). 江西省卫生防疫站, 1980]
- Jing YY, Zhang Z, Wang YG, *et al.* Isolation and identification of pathogenic bacterium associate with ascites disease of cultured *Scophthalmus maximus*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(24): 106–108 [景亚运, 张正, 王印庚, 等. 养殖大菱鲃腹水病原菌的分离与鉴定. *安徽农业科学*, 2016, 44(24): 106–108]
- Ligi T, Oopkaup K, Truu M, *et al.* Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 2014, 72: 56–66
- Li HM, Bai L, Jiang DM, *et al.* Microbial diversity of piggery air detected by 16S rDNA high-throughput sequencing. *Animal Science and Biotechnology*, 2015, 51(3): 81–84 [李红梅, 白林, 姜冬梅, 等. 基于 16S rDNA 高通量测序方法检测猪舍空气微生物多样性. *中国畜牧杂志*, 2015, 51(3): 81–84]
- Li J, Yan XH, Chen JX, *et al.* Studies on the characteristics of pathogenic *Edwardsiella tarda* isolated from diseased *Scophthalmus maximus*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2006, 36(4): 649–654 [李筠, 颜显辉, 陈吉祥, 等. 养殖大菱鲃腹水病原菌的研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(4): 649–654]
- Lin YG, Ye J, Shi TT, *et al.* Isolation and identification of pathogen *Proteus mirabilis* from diseased Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *Fisheries Science*, 2014, 33(12): 800–803 [林亚歌, 叶键, 石婷婷, 等. 中华鳖源奇异变形杆菌的分离鉴定与致病性研究. *水产科学*, 2014, 33(12): 800–803]
- Li S, Sun L, Wu H, *et al.* The intestinal microbial diversity in mud crab (*Scylla paramamosain*) as determined by PCR-DGGE and clone library analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(6): 1341–1351
- Liu HM. Some advances in the epidemiology and molecular biology of *Shigella* in China. *Chinese Journal of Zoonoses*, 1991, 7(2): 7–8 [刘汉明. 中国志贺氏菌属流行病学和分子生物学研究的某些进展. *中国人兽共患病学报*, 1991, 7(2): 7–8]
- Liu W, Zhao SH, Yang SQ, *et al.* Proper identification of *Shigella*. *Practical Preventive Medicine*, 1999, 6(1): 80–81 [刘蔚, 赵树红, 杨淑其, 等. 正确鉴定志贺氏菌属. *实用预防医学*, 1999, 6(1): 80–81]
- Nagai F, Morotomi M, Sakon H, *et al.* *Parasutterella excrementihominis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Alcaligenaceae isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(7): 1793
- Navarrete P, Espejo RT, Romero J. Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbial Ecology*, 2009, 57(3): 550–561
- Pozhitkov AE, Beikler T, Flemmig T, *et al.* High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontology*, 2011, 55(1): 70
- Sun ZL, Xuan YM, Zhang H, *et al.* Bacterial diversity in the *Penaeus vannamei* boone intestine and aquaculture environment. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(3): 594–605 [孙振丽, 宣引明, 张皓, 等. 南美白对虾养殖环境其肠道细菌多样性分析. *中国水产科学*, 2016, 23(3): 594–605]
- Thomson R, Macpherson HL, Riaza A, *et al.* *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(2): 243–250
- Wang RJ, Xiong XJ. Isolation, identification and drug sensitivity tests of *Proteus mirabilis* from rotten-skin disease of *Rana spinosa*. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(4): 31–34 [王瑞君, 熊筱娟. 棘胸蛙烂皮病奇异变形杆菌的分离、鉴定及对药物敏感性研究. *淡水渔业*, 2012, 42(4): 31–34]
- Wang XF, Zhao YF, Song XF, *et al.* Application of high-throughput sequencing techniques for analyzing bacterial communities in pond-raised mud crab (*Scylla paramamosain*) intestine and its aquaculture environment. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(6): 1245–1253 [王贤丰, 赵艳飞, 宋志飞, 等. 应用高通量测序技术分析拟穴青蟹肠道及其养殖环境菌群结构. *中国水产科学*, 2017, 24(6): 1245–1253]
- Xing MX, Li GY, Hou ZH, *et al.* Different taxonomic distribution of gastrointestinal tract microbiome of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) individuals. *Progress in Modern Biomedicine*, 2014, 14(20): 3801–3805 [邢孟欣, 李贵阳, 侯战辉, 等. 不同大菱鲃(*Scophthalmus maximus*)个体肠道菌群结构差异研究. *现代生物医学进展*, 2014, 14(20): 3801–3805]
- Zhang ML, Zhang MH, Zhang CH, *et al.* Pattern extraction of structural responses of gut microbiota to rotavirus infection via multivariate statistical analysis of clone library data. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 70(2): 21
- Zhang QH, Xiong QM, Xiao LL, *et al.* A pathogen isolated from skin-ulcer *Pseudosciaena crocea*—*Proteus mirabilis* ZXS02 strain. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(6): 824–830 [张庆华, 熊清明, 肖琳琳, 等. 大黄鱼溃烂症的一种致病菌——奇异变形杆菌 ZXS02 菌株. *水产学报*, 2005, 29(6): 824–830]
- Zhang WN. Identification of a pathogen associated with swollen abdomen of cultured turbot and antigenicity of its outer membrane proteins. Master's Thesis of Ocean University of

- China, 2006 [张伟妮. 大菱鲆腹水症病原菌的鉴定及其外膜蛋白的抗原性研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2006]
- Zhang XJ, Chen CZ, Fang H, *et al.* *Edwardsiellasis* and its pathogen in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A case report. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(5): 417–423 [张晓君, 陈翠珍, 房海, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)病原鳃利斯顿氏菌的鉴定. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 417–423]
- Zhang Z, Li B, Wang YG, *et al.* The microflora structure in digestive tract of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) cultured in outdoor pond basing on high-through sequencing technique. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 38–45 [张正, 李彬, 王印庚, 等. 基于高通量测序的池塘养殖半滑舌鳎消化道菌群的结构特征分析. 水生生物学报, 2015, 39(1): 38–45]
- Zhang ZD, Gu MY, Wang W, *et al.* Analysis of bacterial community in radiation polluted soils by high-throughput sequencing. *Microbiology China*, 2016
- Zhu PF. Analysis of bacterial communities from turbot (*Scophthalmus maximus*) aquaculture system and construction of DNA microarray detection system for aquaculture pathogenic bacteria. Master's Thesis of First Institute of Oceanography, SOA, 2015 [朱鹏飞. 大菱鲆养殖环境细菌多样性分析及水产病原菌基因芯片检测体系的构建. 国家海洋局第一海洋研究所硕士研究生学位论文, 2015]

(编辑 冯小花)

Turbot (*Scophthalmus maximus*) Biodiversity Assessment Using High-Throughput Illumina Sequencing to Analyze Juvenile Turbot Intestines and Their Bacterial Cultures

WU Huanhuan^{1,2}, WANG Weiji², LÜ Ding², HU Yulong², KONG Jie^{1,2①}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract In order to study the effects of environmental factors on the intestinal flora structure of turbot (*Scophthalmus maximus*), we used high-throughput sequencing to explore the bacterial community structure and diversity in juvenile turbot intestines, the culture environment, and biological baits. The results showed that 547621 effective sequences were detected in nineteen samples, and they could be classified into 3771 operational taxonomic units (OTUs), among which 3038, 1090, 87, and 777 originated from the aquaculture water, the biological baits, healthy juvenile turbot intestine, and diseased juvenile fish intestine, respectively. There were 57 OTUs shared between the healthy juvenile turbot intestine and the biological baits, 0 OTU shared between the healthy juvenile turbot intestine and aquaculture water, 481 OTUs shared between the diseased juvenile fish intestine and the biological baits, 31 OTUs shared between the diseased juvenile fish intestine and the aquaculture water. The effect of biological bait on microbial diversity of intestinal tract of juvenile fish was much greater than that of environment. In total, the predominant phyla in the turbot intestine were Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria. The intestinal microflora of healthy juvenile turbot can be clustered into 8 phyla, and the intestinal microflora of the diseased juvenile fish could be clustered into 19 phyla. Compared with the healthy juveniles, the community structure of the predominant phyla was imbalanced at the intestinal level of the diseased juvenile fish. Furthermore, analysis of the 100 most abundant bacterial OTUs in the different samples revealed that the species dominant in the intestinal bacteria of juvenile fish was closely related to the dominant species in the biological baits. Meanwhile, the intestinal dominant bacteria species of each diseased juvenile are different. This study provided the basis for healthy culture and micro-ecological regulation of turbot.

Key words Biodiversity; High throughput sequencing; Turbot (*Scophthalmus maximus*)

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn